



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

DINAMICHE MICROBICHE NEL FORMAGGIO
CACIOFIORE PRODOTTO CON ESTRATTO ACQUOSO DI
ONOPORDUM TAURICUM COLTIVATO

MICROBIAL DYNAMICS IN *CACIOFIORE* CHEESE
MANUFACTURED WITH AQUEOUS EXTRACT OF
CULTIVATED *ONOPORDUM TAURICUM*
TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:

ANGELICA COMPAGNONI

Relatore:

CHIAR.MO PROF. ANDREA OSIMANI

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	6
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	7
CAPITOLO 1 L'USO DI COAGULANTI VEGETALI IN CASEIFICAZIONE	8
1.1 Il ruolo del caglio nella produzione di formaggio	8
1.2 Tipologie di caglio	9
1.3 Caglio vegetale.....	10
1.3.1 Coagulanti vegetali da fiori di cardo	12
1.3.2 <i>Onopordum tauricum</i> Willd	14
1.4 Formaggi a caglio vegetale in Italia	15
1.5 Caratterizzazione microbiologica di formaggi italiani ottenuti da cardi	15
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	18
2.1 Preparazione all'estratto vegetale sperimentale	18
2.2 Caseificazioni sperimentali	19
2.3 Analisi chimico-fisiche	21
2.4 Analisi microbiologiche	21
2.4.1. Composizione dei terreni di coltura	22
2.5 Analisi statistica	25
CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE	26
3.1 Risultati analisi chimico-fisiche	26
3.2 Risultati analisi microbiologiche	27
CONCLUSIONI	31
BIBLIOGRAFIA	32

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Esempi di fonti di coagulanti vegetali (Roseiro et al., 2003).....	12
Tabella 2: Esempi di formaggi prodotti con estratti acquosi di cardo (Alavi et al., 2020).	14
Tabella 3: Composizione del terreno CCA.....	22
Tabella 4: Composizione del terreno MRS.....	23
Tabella 5: Composizione del terreno M17 agar.	23
Tabella 6: Composizione del terreno PCA.	23
Tabella 7: Composizione terreno PAB.....	24
Tabella 8: Composizione terreno RB.....	24
Tabella 9: Composizione terreno VRBGA.	24
Tabella 10: Risultati delle analisi del pH e della TTA sui formaggi controllo (CF_C) e sperimentali (CF_Ot_ct) nel primo e nel secondo batch di caseificazioni.	26
Tabella 11: Risultati delle conte vitali ($\log \text{cfu g}^{-1}$); lettere differenti nella stessa riga allo stesso tempo di campionamento indicano differenze tra CF_C e CF_Ot_ct secondo il test di Tukey's ($P < 0,05$).....	29

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Infiorescenza di <i>Onopordum tauricum</i>	18
Figura 2: Fasi della preparazione degli estratti vegetali sperimentali.....	19
Figura 3: Diagramma di flusso del processo di produzione del formaggio Caciofiore....	20
Figura 4: Piano sperimentale delle caseificazioni.....	20
Figura 5: Andamento del pH e della TTA durante la maturazione dei formaggi controllo e sperimentali.....	27
Figura 6: Andamento dei LAB e batteri indice di igiene e deterioramento secondo i risultati delle conte vitali in piastra in CF_C (a) e CF_Ot_ct (b).....	30

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

AP	Proteasi aspartiche
a_w	Water Activity, attività dell'acqua
B1	Batch 1
B2	Batch 2
CCA	Chromogenic Coliform Agar
CF_C	Caciofiore controllo
CFot_ct	Caciofiore sperimentale da <i>Onopordum tauricum</i> coltivato
CMP	Caseino macro peptide
DOP	Denominazione origine protetta
FDA	Food and Drug Administration
IGP	Indicazione geografica protetta
LAB	Lactic Acid Bacteria, batteri lattici
MCA	Milk clotting activity, attività coagulante del latte
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
OGM	Organismo geneticamente modificato
Ot	<i>Onopordum tauricum</i>
Otct	<i>Onopordum tauricum</i> coltivato
PAB	<i>Pseudomonas</i> Agar Base
PAT	Prodotti agroalimentari tradizionali
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RB	Rose Bengal
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
T	Temperatura
TTA	Total titratable acidity
UR	Umidità relativa
VRBGA	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i>

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Recenti pubblicazioni su nuovi enzimi proteolitici di origine vegetale per la coagulazione del latte hanno rivelato che i coagulanti vegetali sono un argomento di crescente interesse per la tecnologia lattiero-casearia, nonostante queste proprietà coagulanti siano già note da secoli. Infatti, i fiori maturi dei cardi venivano utilizzati fin dai tempi dei Romani come coagulanti del latte per produrre formaggi tradizionali.

Negli ultimi anni, con l'espansione della produzione mondiale del formaggio, è nata la necessità di cercare sostituti al consueto caglio animale per diversi motivi: elevato costo nel mercato, minore disponibilità dalla metà del Novecento di stomaci ruminanti, disposizioni religiose (ad esempio Islam ed Ebraismo), diffusione dell'alimentazione vegetariana e il divieto sull'utilizzo della chimosina ricombinante in alcuni Paesi. Tutto ciò ha spinto la ricerca allo studio di nuove tipologie di coagulanti e alla riscoperta di quelli di origine vegetale, che risultano interessanti anche per la loro facilità d'estrazione. Ad oggi, l'estratto da fiori di *Cynara cardunculus* risulta l'unico coagulante vegetale commercializzato.

Lo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di studiare le dinamiche microbiche durante la maturazione del formaggio *Caciofiore* ottenuto attraverso la coagulazione con un estratto acquoso di fiori coltivati di *Onopordum tauricum* Willd. per comprendere l'effetto del coagulante sperimentale sul microbiota e micobiota. I formaggi sperimentali sono stati campionati e analizzati ad intervalli regolari (0, 5, 30, 60 giorni di maturazione) e confrontati con formaggi di controllo ottenuti utilizzando un coagulante vegetale commerciale ottenuto da *Cynara cardunculus*.

Capitolo 1

L'uso di coagulanti vegetali in caseificazione

1.1 Il ruolo del caglio nella produzione di formaggio

“Il nome "formaggio" o "cacio" è riservato al prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale di cucina”. Questa è la definizione presente nell’articolo 32, capo IV, del R.D.L. 15 ottobre 1925, n. 2033, “Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari” (Gazzetta, 1925). Il caglio, definito anche presame, è un composto utilizzato per la lavorazione di formaggi e altri derivati del latte, ricco di enzimi; esso è l’elemento chiave che permette la coagulazione delle caseine, che sono contenute nel latte, comportando il primo cambiamento di struttura da liquido a gel (Farris et al., 2012). Il caglio può avere origine animale, vegetale o microbica: quello di origine animale continua ad essere il più utilizzato, soprattutto per la produzione di formaggi DOP. In generale, la coagulazione del latte ad opera del presame avviene in tre fasi:

1. Fase primaria, anche detta enzimatica specifica (formazione del caseinomacropetide, CMP);
2. Fase secondaria, o fisico- chimica (formazione del gel);
3. Fase terziaria, detta enzimatica aspecifica (idrolisi del fosfoparacaseinato).

Il presame (caglio animale) viene aggiunto al latte ad una temperatura di 30-37 °C; questo contiene una miscela di enzimi proteolitici (principalmente chimosina, anche detta rennina, che svolge il 95% dell’attività enzimatica). In particolare, durante la coagulazione presamica, la chimosina idrolizza la k-caseina interrompendo il legame peptidico tra gli amminoacidi 105 (fenilalanina) e 106 (metionina), determinando in questo modo la rimozione del peptide colloidal-protettore (rappresentato dalla parte c-terminale della proteina); perdendo tale peptide (CMP), l’idrofilia delle micelle caseiniche si riduce, mentre aumenta la loro tendenza all’aggregazione. Il CMP si ritroverà nel siero, mentre il residuo 1-105 della k-caseina prende il nome di para-k-caseina (o paracaseinato). Il distacco del peptide C-terminale della k-caseina induce la precipitazione delle micelle caseiniche e la formazione di un reticolo tridimensionale (gel), capace di trattenere lattosio, sali minerali e globuli lipidici. Tipologia, consistenza e proprietà del coagulo sono determinate da una serie di fattori legati sia alle proprietà del substrato, sia alle proprietà degli enzimi coagulanti. Il valore di pH del latte, prima

dell'impiego del caglio, regola la sua attività enzimatica. In seguito, il siero, matrice acquosa che contiene le sostanze idrosolubili del latte, si separa dal coagulo (Farris et al., 2012)

1.2 Tipologie di caglio

Esistono diversi tipi di caglio che differiscono per origine e modalità di estrazione: animale, vegetale e microbico.

Il caglio animale è un complesso multi-enzimatico composto da proteasi, ricavato dall'abomaso dei giovani ruminanti, quali vitelli, agnelli o capretti, che vengono abbattuti prima dello svezzamento. Il caglio animale è l'unico che può essere utilizzato per produrre i principali formaggi DOP di eccellenza italiani, quali Parmigiano Reggiano, Caciocavallo Silano, Pecorino Romano e Castelmagno. I principali enzimi contenuti nel caglio sono la chimosina (95%), che è l'agente coagulante più utilizzato, e la pepsina (5%). Il caglio animale si può trovare sotto diverse forme (Fiorucci et al., 2021):

- In pasta, deriva dalla stagionatura dell'abomaso con all'interno il latte coagulato e un pool enzimatico, costituito da chimosina e pepsina, impastati con diversi ingredienti, fra cui NaCl, farina ed aceto. Possiede sia un elevato contenuto microbico che di lipasi; queste ultime vanno ad agire sul grasso del latte promuovendo la liberazione di acidi grassi liberi, che conferiscono al formaggio un caratteristico sapore piccante.

- Liquido: è un infuso acquoso di colore marrone ed aroma caratteristico, ottenuto dagli stomaci dei ruminanti, a cui viene aggiunto acido cloridrico o citrico per ridurre il pH, e conservanti (sale e sostanze ad azione antisettica), per migliorarne la stabilità microbiologica e funzionale.

- In polvere: è un infuso acquoso concentrato ed essiccato. Si ottiene aggiungendo sale al caglio liquido finché non si raggiunge il punto di saturazione, consentendo alla chimosina di precipitare, per poi essere miscelata al sale ed essiccata. Questa tipologia di prodotto presenta un contenuto in chimosina molto elevato (>95%), che risulta particolarmente adatto a produrre formaggi duri a lunga stagionatura, come il Parmigiano Reggiano e il Grana Padano (Fiorucci et al., 2021).

Il caglio vegetale per la coagulazione, invece, fa parte di una metodologia antica, tradizionale dell'area mediterranea. Gli antichi romani, infatti, utilizzavano il caglio proveniente dal cardo per ottenere formaggi freschi, da consumare in pochi giorni. L'argomento verrà approfondito nel paragrafo 1.3.

Per quanto riguarda il caglio microbico, questo tipo di caglio rappresenta sia una valida alternativa al caglio animale, sia un prodotto più economico e facilmente reperibile rispetto al caglio di origine vegetale, poiché viene prodotto attraverso un semplice processo fermentativo che consente di ottenere un quantitativo elevato di prodotto ad un prezzo molto più conveniente, senza tralasciare che la sua origine viene maggiormente apprezzata dai consumatori vegetariani. Le proteasi vengono estratte principalmente dalle muffe: *Rhizomucor miehei* (muffa termofila del suolo), *Rhizomucor pusillus* (muffa mesofila del suolo) e *Cryphonectria parasitica*. Tali preparati commerciali vengono venduti sterili e, per la loro commercializzazione, è necessario superare rigidi controlli tossicologici per verificare la possibile presenza indesiderata di antibiotici e aflatossine (Fiorucci et al. 2021). Tuttavia, in alcuni Paesi, i coagulanti microbici non sono stati accettati per la produzione regolare di formaggio perché si ritiene che comportino una resa ridotta e un prodotto di qualità inferiore; questo vale in particolare per la produzione del formaggio Cheddar (Garg et al., 2009).

Negli ultimi anni è stata introdotta anche un'ulteriore tipologia di caglio: la chimosina ricombinante (da microrganismi geneticamente modificati), che ha ottenuto l'approvazione della FDA per le applicazioni casearie per la produzione di formaggi nel 1989 (Fernandez-Salguero et al., 2003). Su questo prodotto non esistono ancora molte informazioni, infatti, il suo utilizzo è sottoposto a numerosi vincoli legislativi e vietato per le produzioni di formaggi DOP. Come è noto a tutti, il DNA contiene tutte le informazioni genetiche di un organismo, è organizzato in geni ed è presente in ogni cellula. Ogni gene è responsabile della codificazione di una proteina specifica che viene sintetizzata dopo il trasferimento del codice genetico dal cromosoma al citoplasma cellulare; ciò avviene ad opera dell'mRNA. Inserendo i geni che codificano la chimosina in microrganismi non patogeni e di cui si può controllare il processo di crescita, si ottengono dei prodotti con gli stessi caratteri della chimosina bovina, in grado, quindi, di coagulare il latte. Dal punto di vista strettamente tecnologico, questi tipi di caglio genetici sono ottimi in termini di resa alla caseificazione. Essi hanno, infatti, un'attività coagulante superiore rispetto ai cagli microbici tradizionali ed anche per questi è necessaria un'analisi igienico-sanitaria per valutarne la sicurezza nell'utilizzo (Del Franco, 2022).

1.3 Caglio vegetale

I cagli o coagulanti vegetali sono delle proteasi vegetali, ossia enzimi caratteristici delle piante e coinvolti in tutto il loro ciclo di vita, dalla mobilitazione delle proteine di riserva durante la germinazione dei semi, all'inizio della morte cellulare.

Le proteasi vegetali sono divise in gruppi in base al meccanismo catalitico usato durante il processo idrolitico. Le principali tipologie di proteasi vegetali sono qualificate come segue:

- aspartiche,
- seriniche,
- cisteiniche,
- metallo-proteasi.

La capacità coagulante del caglio vegetale è dovuta soprattutto alla presenza di proteasi aspartiche.

Le proteasi aspartiche più caratterizzate sono la cardosina A e la cardosina B. Come la chimosina, la cardosina A scinde la k-caseina bovina (k-CN) tra Phe105 e Met106, mentre la cardosina B è simile alla pepsina in termini di specificità e attività (Padros et al., 2007).

Questi enzimi sono caratterizzati da un'elevata attività di coagulazione e da una forte attività proteolitica che produce formaggi con una consistenza cremosa e morbida e un aroma genuino e leggermente piccante (Fernandez-Salguero et al., 2002). La ricerca di nuovi potenziali enzimi di coagulazione del latte dalle piante è in continuo progresso per renderli industrialmente utili a seguito della crescente domanda globale di produzione di formaggi diversificata e di alta qualità (Hashim et al., 2011).

I formaggi prodotti con coagulanti vegetali sono normalmente prodotti su scala artigianale in piccoli caseifici, ricoprendo un importante ruolo socio-economico nel settore lattiero-caseario a livello locale. Spesso questi formaggi prendono il nome dalla Regione in cui vengono prodotti e le tecniche di produzione utilizzate dagli agricoltori sono molto tradizionali (Roseiro et al., 2003).

Diversi estratti vegetali che hanno la capacità di coagulare il latte hanno anche un'attività proteolitica (Tabella 1). Queste proteasi, come la ficina di *Ficus* sp., la papaina di *Carica papaya* e le cardosine (chiamate anche cinarasi o ciprosine) di *Cynara* sp., sono talvolta costituenti del lattice, dei frutti, delle radici, dei semi e/o della linfa, ma soprattutto delle foglie o dei fiori (Roseiro et al., 2003).

Nella tabella 1 sono riportati alcuni esempi di fonti vegetali per l'estrazione di coagulanti.

Nome scientifico	Nome comune	Riferimenti
<i>Albizia julibrissin</i>	Albero della seta	Garg et al., 1994
<i>Ananas comosus</i>	Ananas	Cattaneo et al., 1994
<i>Calotropis procera</i>	Mela di sodoma	Aworth et al., 1987, Ibiama et al., 1987
<i>Carica papaya</i>	Papaya	

<i>Centaurea calcitrapa</i>	Cardo rosso stellato	Veringa et al., 1961
<i>Cirsium</i>	Cardo	Tavaria et al., 1997
<i>Cucurbita pepo</i>	Zucca	Robinson, 1998
<i>Cynara cardunculus</i> ,	Cardo e carciofo	Barbosa, 1983
<i>C. humilis</i> , <i>C. scolymus</i>		Vieira de Sa, 1970
<i>Ficus carica</i> , <i>F. glomerata</i> ,	Fico	Veringa et al., 1961
<i>F. religiosa</i>		
<i>Lactuca sativa</i>	Lattuga	Lo Piero et al., 2002
<i>Silybum marianum</i>	Cardo santo	Christen et al., 1935
<i>Streblus asper</i>	Albero khoi	Veringa et al., 1961
<i>Taraxacum officinale</i>	Dente di leone	Garg et al., 1994
<i>Withania coagulans</i>	Withania	Veringa et al., 1961

Tabella 1: Esempi di fonti di coagulanti vegetali (Roseiro et al., 2003).

1.3.1 Coagulanti vegetali da fiori di cardo

Nelle aree del Mediterraneo occidentale e centrale gli estratti acquosi grezzi con proprietà di coagulazione del latte sono tradizionalmente preparati da piante erbacee spontanee comunemente indicate come “cardi” e scientificamente attribuite a diversi generi all’interno della famiglia delle *Asteraceae*, come *Cynara* (principalmente *C. cardunculus*, *C. scolymus*, e *C. humilis*), *Silybum*, *Centaurea*, *Carlina*, *Cirsium* e *Onopordum* (Alavi et al., 2020).

Tre proteinasi di *C. cardunculus* L. sono state isolate, purificate e parzialmente caratterizzate in termini di attività (Heimgartner et al., 1990; Cordeiro et al., 1992). Oltre alle cardosine A e B, isolate da stigmi freschi (Verissimo et al., 1995, 1996; Ramalho-Santos et al., 1996), possiedono anche proteinasi acide appartenenti al gruppo delle proteinasi aspartiche chiamate “chinasi” o “ciproline” (Cordeiro et al., 1994). *Cynara cardunculus* è di gran lunga la specie più studiata e utilizzata in caseificazione, mentre i tratti chimici, tecnologici e nutrizionali di altre specie di cardo non sono stati ancora completamente descritti (Mozzon et al., 2020).

Il caglio da cardo si ottiene mediante l’estrazione con acqua degli enzimi presenti nei fiori (pistilli). L’estratto acquoso di cardo è termostabile e presenta una elevata attività proteolitica, di molto superiore a quella del caglio convenzionale (caglio liquido di vitello). Ha caratteristiche molto positive rispetto al caglio di origine animale: grazie all’elevata attività proteolitica, infatti, è possibile ottenere formaggi di spiccate qualità organolettiche ed elevata

digeribilità; tuttavia, tale caratteristica può comportare riduzioni nella resa casearia e difetti legati al gusto (amaro) e alla texture del prodotto (Formaggio da caglio di cardo, 2019). Spagna e Portogallo hanno la più grande varietà e produzione di formaggi a latte crudo di pecora e capra con coagulanti vegetali da cardo (tabella 2), che sono prodotti principalmente su scala artigianale (e.g. Serra de Estrela, Serpa, Azeitão, Nisa, Castelo Branco, Évora, Casar de Cáceres, Torta del Casar, Los Pedroches, La Serena, Los Ibores, Flor de Guía), e ad alcuni di essi è stata concessa una Denominazione di Origine Protetta (DOP) dall'Unione Europea. I formaggi prodotti con questa modalità sono caratterizzati da una consistenza morbida e burrosa e da un sapore leggermente amaro (Tavaria et al., 2001), anche se le loro proprietà organolettiche possono variare. Infatti, diversi fattori sono noti per influenzare la composizione e l'attività enzimatica del caglio vegetale e, quindi, le proprietà tecnologiche e sensoriali del formaggio. Le condizioni di lavorazione come il trattamento di macerazione, la temperatura di essiccazione, così come la varietà di fiori, la posizione geografica, la fase di maturazione al momento del raccolto e il contenuto di umidità finale svolgono un ruolo importante nelle proprietà del caglio vegetale (Gostin et al., 2019).

Paese	Tipologia di latte	Nome del formaggio	Riferimenti
Portogallo	Latte ovino	Serra da estrela	Tavari et al., 2006
	Latte bovino	Castelo Branco	Ferreira et al., 2009
Spagna	Latte ovino	La Serena	Fernandez-García et al., 2008; Garde et al., 2007; Roa et al., 1999
		Torta del Casar	Francisco-José et al., 2010; Ordiales et al., 2013
	Latte carpino	Burgos	Timon et al., 2014
		Manchego	Prados et al., 2007
		Los Pedroches	Fernandez-Salguero et al., 2002
Murcia al Vino	Abellán et al., 2012; Tejada et al., 2008		

Italia	Latte ovino Latte bovino o miscela di latte vaccino e ovino	Pecorino Caciotta	Chen et al., 2003 Aquilanti et al., 2011
--------	--	----------------------	---

Tabella 2: Esempi di formaggi prodotti con estratti acquosi di cardo (Alavi et al., 2020).

1.3.2 *Onopordum tauricum* Willd

Onopordum è un genere di pianta angiosperma dicotiledone appartenente alla famiglia delle *Asteraceae*, dall'aspetto di erbacee annuali o perenni tipicamente provviste di aculei.

Queste piante sono alte mediamente tra i 0,5 e 2 m, fino a 4 m nelle forme naturalizzate in America). La forma biologica della maggior parte delle specie (almeno per le specie europee) è emicriptofita biennale, ovvero piante con ciclo vitale biennale che conservano le gemme ibernanti a livello del terreno. Il primo anno, queste piante formano perlopiù una rosetta basale, mentre fioriscono il secondo anno. La distribuzione è prevalentemente mediterranea: Europa meridionale, Africa settentrionale, Asia occidentale e Isole Canarie.

L'infiorescenza (capolino emisferico, 4-6 cm di diametro) è costituita da fiori tubolari rosa-viola lunghi fino a 3 cm (Zenobi et al., 2021).

L'attività coagulante dell'estratto acquoso di *Onopordum tauricum* selvatico è stata valutata per la prima volta nel latte di diverse specie (pecora, capra, vacca) da Mozzon et al. (2020).

Tra le varie parti anatomiche aeree della pianta, quali ricettacolo, foglie, steli e fiori, solo questi ultimi hanno mostrato proprietà coagulanti. L'attività coagulante (*Milk Clotting Activity*, MCA) è stata misurata in funzione di tre variabili indipendenti quali temperatura, pH e volume di estratto, utilizzando la metodologia delle superfici di risposta (RSM). La combinazione dei parametri operativi che ottimizzano l'attività di coagulazione dell'estratto di *O. tauricum* è stata osservata ad una temperatura di 55°C, pH compreso tra 4,9 e 5,7 e volume di coagulante pari a 300-500 mL. In queste condizioni ottimali, l'MCA previsto è compreso tra i valori di 798 e 1005 [U], con il valore più alto misurato nel latte di pecora crudo.

Per comprendere meglio il comportamento tecnologico degli estratti di *O. tauricum*, è necessario effettuare studi comparativi di attività proteolitiche caseinolitiche e non specifiche e completare con studi sulle proprietà reologiche dei gel di latte e sulle proprietà sensoriali (consistenza, sapore, colore) dei formaggi stagionati (Mozzon et al., 2020).

1.4 Formaggi a caglio vegetale in Italia

Queste antiche tradizioni casearie, tipiche del bacino del Mediterraneo, che utilizzano estratti di cardo come mezzo di caseificazione, ancora oggi sono mantenute in regioni come Toscana, Marche, Lazio, Abruzzo, Puglia e Sardegna.

Nel Lazio il *Caciofiore* è certificato come Prodotto agroalimentare tradizionale (PAT), in particolare nell'area della campagna romana acquisisce anche la certificazione di presidio Slow food con il prodotto "*Caciofiore di Columella*".

In Toscana si ricorda la DOP del "*Pecorino delle Balze Volterrane*", ed in Sardegna il "*Fiore Sardo*", altra DOP prodotta nelle province di Nuoro, Sassari e Cagliari. Con la stessa tipologia di coagulante si producono anche altre PAT regionali, tra cui il *Caciofiore* dell'Abruzzo prodotto con latte di pecora e la "*Caciotta vaccina al caglio vegetale*" prodotta nelle Marche con latte di vacca.

Oltre all'estratto di cardo, diverse sono le produzioni casearie basate sull'impiego del lattice di fico. In questo ambito i formaggi più conosciuti sono: il "*Caprino di latte di fico*", PAT della Regione Marche, il "*Raviggiolo di pecora pistoiese*" prodotto con latte ovino coagulato con una miscela di caglio animale e lattice di fico, la "*Pampanella*" pugliese, prodotta con latte vaccino o anche misto (vaccino, caprino, ovino) e la "*Pampanella abruzzese PAT*" prodotta utilizzando solo latte caprino. Il "*Ficu*", formaggio prodotto da latte pastorizzato di capra della Razza Girgentana, è prodotto in Sicilia impiegando sempre come agente coagulante il lattice di fico (Liburdi, 2019).

La produzione di formaggio con caglio vegetale non è ancora molto diffusa a livello industriale, per cui per assaggiare un formaggio di questo tipo è necessario recarsi presso piccoli produttori artigianali e locali, che spesso conservano ricette antiche.

1.5 Caratterizzazione microbiologica dei formaggi italiani ottenuti da cardo

È noto che i coagulanti vegetali influenzano la qualità del prodotto finale; per valutarne l'utilizzo, oltre all'attività coagulante e proteolitica, è importante comprendere l'effetto sulle caratteristiche chimico-fisiche, microbiologiche, reologiche e sensoriali dei formaggi. La maggior parte degli studi in letteratura riguarda l'influenza del caglio vegetale sui parametri chimico-fisici e gli attributi sensoriali, minori invece sono quelli sul microbiota. Generalmente si effettuano delle conte vitali in piastra di diversi gruppi microbici, sia indicatori di igiene e qualità (es: enterobatteri e stafilococchi), sia pro-tecnologici, relativi alla fermentazione e alla maturazione (lattobacilli, lattococchi, enterococchi, streptococchi e lieviti), ma oggigiorno sono disponibili anche numerose tecniche coltura-indipendenti per studiare le comunità

microbiche di alimenti complessi come il formaggio. I batteri lattici sono predominanti sia nei formaggi in cui sono utilizzate colture starter per guidare la fermentazione, sia in quelli prodotti “naturalmente”, senza aggiunta di starter, in cui predomina il microbiota autoctono derivante dalle materie prime e dagli ambienti di lavorazione (Vioque et al., 2000; Roseiro et al., 2003; Macedo et al., 2004). In alcuni studi volti all’identificazione delle principali specie microbiche nei formaggi a latte ovino coagulati con caglio vegetale, è stata riportata la presenza di *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus faecium* (Freitas & Malcata, 2000).

Aquilanti et al. (2011) hanno indagato le dinamiche batteriche del formaggio Caciotta, (Montefeltro, Centro Italia) prodotto con latte vaccino crudo ed estratto acquoso di fiori secchi da *C. cardunculus* attraverso metodi convenzionali (conte vitali e isolamento di LAB) e un approccio combinato PCR-DGGE, per l’analisi del DNA estratto direttamente dai campioni e dalle cellule coltivate su terreni solidi selettivi per i batteri lattici. È stata trovata una popolazione eterogenea, caratterizzata soprattutto da enterococchi, lattococchi, lattobacilli e microrganismi deterioranti. I risultati delle analisi microbiologiche convenzionali hanno rivelato che:

- i batteri mesofili aerobi totali hanno raggiunto il massimo valore al quarto giorno di maturazione, dopo il quale sono rimasti stabili fino alla fine della maturazione;
 - le conte più alte di lattobacilli e lattococchi sono state osservate dopo 1 giorno di maturazione, dopodiché i valori sono gradualmente diminuiti fino alla fine della maturazione;
 - le cariche di *Escherichia coli* alla fine della maturazione erano sotto il limite di rilevazione.
- Dall’analisi del DNA estratto direttamente dai campioni è emerso che il latte crudo, la cagliata ed il formaggio erano caratterizzati dalla presenza di *Limosilactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Per quanto riguarda l’estratto acquoso dei fiori di *C. cardunculus*, è stata evidenziata la presenza di *Staphylococcus pasteurii* e *Macroccoccus caseolyticus*, mentre non sono state riscontrate specie di batteri lattici; nessuna delle specie trovate nel caglio vegetale è diventata predominante durante il processo di produzione.

Anche nel lavoro di Cardinali et al. (2016), sulle dinamiche dei lieviti e delle muffe nel formaggio Caciofiore della Sibilla coagulato con un estratto acquoso di *Carlina acanthifolia* All., è emerso il latte crudo e l’ambiente di lavorazione hanno rappresentato le principali contaminazioni fungine, mentre un effetto praticamente trascurabile è stato attribuito al caglio

vegetale da cardo. Invece, in uno studio successivo (Cardinali et al., 2017) è stato osservato che il caglio da cardo ha influenzato chiaramente le dinamiche batteriche iniziali del formaggio *Caciofiore della Sibilla*; infatti, *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius*, *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus*, rilevati nella fillosfera di *C. acanthifolia*, sono stati ritrovati nell'estratto vegetale usato come coagulante e nella cagliata. Inoltre, è stato ipotizzato che anche altri gruppi batterici trovati tramite la tecnica PCR-DGGE derivavano dal caglio vegetale (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides*). Alla fine della maturazione, il sequenziamento Illumina ha dimostrato che sia i formaggi ottenuti da caglio vegetale, che quelli da caglio animale, erano dominati da *Lactobacillales*, però, mentre i formaggi prodotti con caglio vegetale erano co-dominati da *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, nei formaggi ottenuti con caglio animale è stata osservata la prevalenza di *Lactococcus*, seguito da *Lactobacillus*.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione all'estratto vegetale sperimentale

Per le prove di caseificazione del formaggio Caciofiore è stato utilizzato un estratto acquoso liofilizzato ottenuto dai fiori coltivati di *Onopordum tauricum* Willd come coagulante vegetale. Dopo la raccolta dei capolini (figura 1), i fiori sono stati separati manualmente dal ricettacolo e lasciati a macerare in acqua demineralizzata (1:10 p/v) per 24 ore. L'estratto acquoso grezzo è stato quindi filtrato mediante un panno in mussola e successivamente centrifugato a 5000x giri per 10 minuti. Dopo la rimozione delle impurità, l'estratto crudo (CE_ct, Crude extract da fiori coltivati) è stato liofilizzato e stoccato a -20°C e ricostituito in acqua demineralizzata (1:10 p/v) soltanto al momento dell'uso. Le fasi seguite per la preparazione (Mozzon et al., 2020) del CE_ct sono schematizzate in figura 2.



Figura 1: Infiorescenza di Onopordum tauricum.

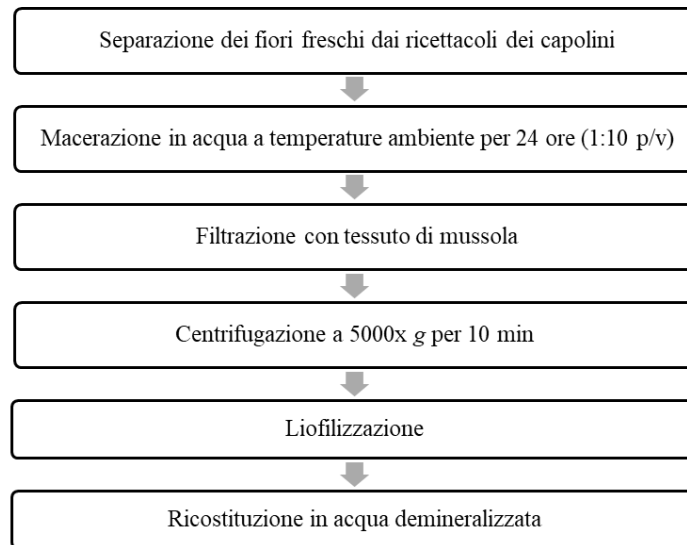


Figura 2: Fasi della preparazione degli estratti vegetali sperimentali.

2.2 Caseificazioni sperimentali

Le prove di caseificazione del formaggio Caciofiore sono state effettuate in un caseificio a conduzione familiare situato a Pieve Torina (MC, Marche, Italia) seguendo un metodo di lavorazione tradizionale che prevede l'utilizzo di latte crudo di pecora e nessuna aggiunta di fermenti lattici starter (figura 3). Brevemente, il processo inizia con la raccolta del latte crudo di pecora di razza Sopravissana, che in seguito alla filtrazione, viene riscaldato fino a 37° C, temperatura alla quale viene aggiunto il caglio. La coagulazione avviene in 30-40 minuti e si procede quindi con la rottura della cagliata attraverso un tipico spino di legno fino al raggiungimento di grani di dimensioni del chicco di riso. Successivamente, la cagliata viene trasferita in stampi forati di plastica (7 cm di diametro x 8 cm di altezza), pressata manualmente per rimuovere il siero e salata a secco. Dopo la rimozione del sale, infine i formaggi vengono stagionati per 60 giorni in condizioni controllate (T:12-13°C; U.R.:70%).

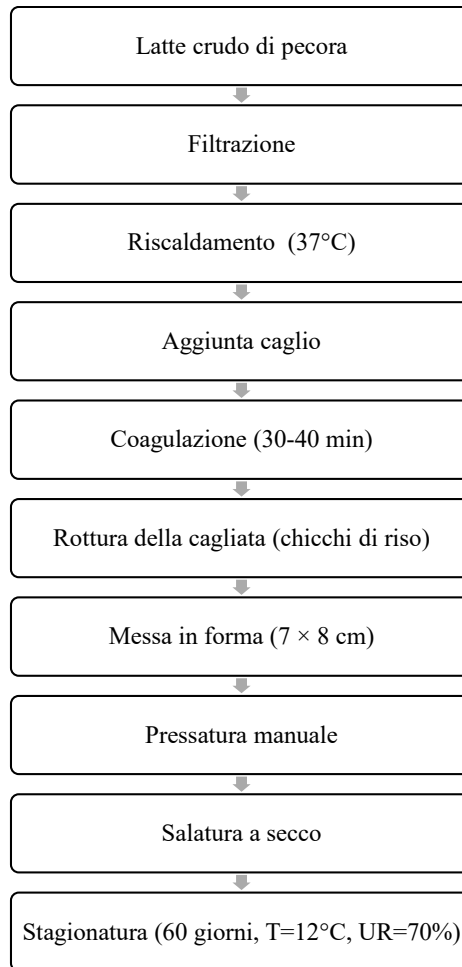


Figura 3: Diagramma di flusso del processo di produzione del formaggio Caciofiore.

Le prove di caseificazione sono state ripetute in due giornate differenti, quindi utilizzando due batch di latte (B1 & B2). Parallelamente ai formaggi sperimentali sono stati prodotti dei formaggi controllo tramite un coagulante vegetale commerciale estratto da *Cynara cardunculus*. Lo schema del piano sperimentale è rappresentato in figura 4.

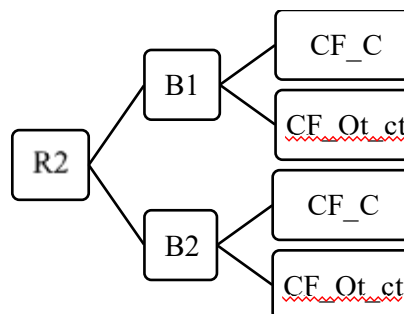


Figura 4: Piano sperimentale delle caseificazioni.

I formaggi sono stati campionati e analizzati dopo 0, 5, 30 e 60 giorni per lo studio delle dinamiche microbiche durante la maturazione. Le analisi sono state condotte anche sul latte crudo utilizzato per le caseificazioni.

2.3 Analisi chimico-fisiche

Per ogni campione (latte e formaggi) sono stati misurati i valori di pH e acidità totale titolabile (TTA). Per la misurazione del pH è stato utilizzato un pH-metro equipaggiato con un elettrodo solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italia). La TTA è stata determinata su 10 g di campione omogeneizzati in 90 ml di acqua distillata per 2 minuti a 260 rpm attraverso un apparecchio Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milano, Italia); la soluzione omogenea risultante è stata titolata con NaOH 0,1 M fino al raggiungimento di un valore di pH di 8,3 (risultati sono espressi come volume (ml) di NaOH aggiunta). Inoltre, è stata determinata l'attività dell'acqua (a_w) dei formaggi a fine maturazione attraverso lo strumento A_w Therm (Rotronic, Bassersdorf, Swiss).

2.4 Analisi microbiologiche

Al fine di quantificare diversi gruppi microbici durante la maturazione, sono state effettuate delle conte vitali in piastra sul latte e sui formaggi. Nello specifico, 10 g di ciascun campione sono stati omogeneizzati in 90 mL di acqua peptonata (peptone 1 g L⁻¹) sterile utilizzando il dispositivo Stomacher (400 Circulator, International PBI, Milano, Italia) per 2 minuti a 260 rpm. Sono state quindi allestite diluizioni seriali decimali per l'enumerazione dei seguenti microrganismi:

- Lattococchi e cocchi termofili su terreno M17 Agar, incubato per 48 ore rispettivamente a 22°C e 45°C;
- Lattobacilli su terreno De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) agar incubato a 37°C per 48-72 ore;
- Mesofili aerobi totali su terreno Plate Count Agar (PCA) incubato a 30°C per 48 ore;
- *Enterobacteriaceae* su mezzo di crescita Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) incubato a 37 °C per 24 ore.
- Coliformi ed *Escherichia coli* su terreno differenziale Chromogenic Coliform Agar (CCA) incubato a 37°C per 24 ore. La presenza di substrati cromogenici nel terreno

permette la differenziazione di coliformi (colonie rosa) ed *Escherichia coli* (colonie blu).

- Pseudomonadaceae su terreno Pseudomonas Agar Base (PAB) con supplemento selettivo Ceftrimide-Fucidin-Cephalosporin (CFC) incubato a 30°C per 24-48 ore.
- Lieviti e muffe su terreno Rose Bengal (RB) agar incubato a 25°C per 48 ore.

2.4.1 Composizione dei terreni di coltura

Di seguito sono riportate le composizioni dei terreni di coltura selettivi utilizzati per l'enumerazione dei gruppi microbici precedentemente elencati:

- **Chromogenic Coliform Agar (CCA)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Idrolizzato enzimatico di caseina	1
Estratto di lievito	2
Sodio di cloruro	5
Sodio fosfato monobasico diidrato	2,2
Sodio fosfato bifasico	2,7
Sodio piruvato	1
sorbitolo	1
triptofano	1
Tergitol 7	0,15
Salmon- β -galattoside	0,2
<i>X-β-glucuronide</i>	0,1
<i>Isopropiyl-β-D-tiogalactopiranoside (IPTG)</i>	0,1
Agar	10,6

Tabella 3: Composizione del terreno CCA.

- **De Man Rogosa Sharpe (MRS)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Digerito enzimatico caseina	10
Estratto di carne	10

Estratto di lievito	4
glucosio	20
Fosfato di dipotassio	2
Sodio acetato	5
Triammonio acetato	5
Magnesio solfato	0,2
Manganese solfato	0,05
Tween 80	1
<i>Agar</i>	15

Tabella 4: Composizione del terreno MRS.

- **M17 agar**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Idrolizzato enzimatico di caseina	2,5
peptone	2,5
Peptone di soia	5
Estratto di lievito	2,5
Estratto di carne	5
Sodio glicerofosfato	19
Magnesio solfato	0,25
Acido ascorbico	0,50
Lattosio	5
Agar	13

Tabella 5: Composizione del terreno M17 agar.

- **Plate Count Agar (PCA)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
triptone	5
Estratto di lievito	2,5
Glucosio	1
Agar	15

Tabella 6: Composizione del terreno PCA.

- **Pseudomonas Agar Base (PAB) (WVR Chemicals) (Mead & Adams, 1977)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Peptone di gelatina	16
Idrolizzato acido di caseina	10
Potassio solfato anidro	10
Magnesio cloruro anidro	1,4
Agar	11,5

Tabella 7: Composizione terreno PAB.

- **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB) (WVR Chemicals)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Peptone micologico	5
Potassio fosfato bifasico	1
Magnesio solfato	0,5
Glucosio	10
Rosa bengala	0,05
Agar	15
Cloramfenico	0,1

Tabella 8: Composizione terreno RB.

- **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (WVR Chemical)**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE [g/L]
Digerito enzimatico tessuti animali	7
Estratto di lievito	3
Cloruro di sodio	5
Saloi biliari	1,5
Glucosio	10
Rosso neutro	0,03
Cristal violetto	0,02
Agar	15

Tabella 9: Composizione terreno VRB

2.5 Analisi statistica

Il test Honest Significant Differences (HSD) di Tukey – Kramer (livello di significatività 0,05) è stato utilizzato per valutare le differenze tra formaggi controllo e formaggi sperimentali allo stesso tempo di maturazione attraverso analisi della varianza ad una via (ANOVA).

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Analisi chimico fisiche

I risultati delle determinazioni del pH e della TTA del latte, dei formaggi controllo (CF_C) e dei formaggi sperimentali (CF_Ot_ct) a diversi tempi di campionamento sono mostrati in tabella 10. I valori riportati per ogni Batch derivano da una media di due misurazioni indipendenti sullo stesso campione (doppio tecnico); inoltre, al fine di confrontare l'andamento dei parametri misurati tra i formaggi controllo e sperimentali durante la maturazione, sono state calcolate le medie totali risultanti da quattro misurazioni (2 per ogni batch).

pH						
<i>Campione</i>	<i>CF_C</i>			<i>CF_Ot_ct</i>		
	B1	B2	Media	B1	B2	Media
<i>Latte</i>	6,54	6,57	6,56 ± 0,02	6,54	6,57	6,56 ± 0,02
<i>t_0</i>	6,50	6,47	6,49 ± 0,03	6,41	6,43	6,42 ± 0,03
<i>t_5</i>	5,30	5,28	5,29 ± 0,09	5,24	5,27	5,25 ± 0,12
<i>t_30</i>	4,94	4,97	4,96 ± 0,03	4,94	4,97	4,95 ± 0,04
<i>t_60</i>	4,98	5,19	5,08 ± 0,13	5,10	5,08	5,09 ± 0,02
TTA						
<i>Campione</i>	<i>CF_C</i>			<i>CF_Ot_ct</i>		
	B1	B2	Media	B1	B2	Media
<i>Latte</i>	1,65	1,95	1,80 ± 0,18	1,65	1,95	1,80 ± 0,18
<i>t_0</i>	0,85	1,05	0,95 ± 0,17	1,30	1,80	1,55 ± 0,30
<i>t_5</i>	4,60	7,15	5,88 ± 1,57	4,25	3,80	4,03 ± 0,42
<i>t_30</i>	6,65	9,80	8,23 ± 1,88	8,20	8,20	8,20 ± 0,29
<i>t_60</i>	10,76	8,05	9,40 ± 1,61	9,00	8,05	8,53 ± 0,68

Tabella 10: Risultati delle analisi del pH e della TTA sui formaggi controllo (CF_C) e sperimentali (CF_Ot_ct) nel primo e nel secondo batch di caseificazioni.

Come mostrato in figura 5, sia nei formaggi controllo che sperimentali è stata osservata una rapida decrescita del pH dopo 5 giorni di maturazione; tra il tempo 5 e il tempo 30 il pH è diminuito, ma con minore velocità, mentre all'ultimo tempo di campionamento (60 giorni di maturazione) è stato rilevato un leggero aumento. Per i valori di TTA è stato osservato un andamento opposto, ma in questo caso la crescita è stata positiva fino all'ultimo giorno di maturazione. Per quanto riguarda l'attività dell'acqua dei formaggi a fine maturazione, non sono state riscontrate differenze significative tra il Caciofiore controllo (CF_C, $0,91 \pm 0,01$) e il Caciofiore sperimentale (CF_Ot_ct, $0,90 \pm 0,01$).

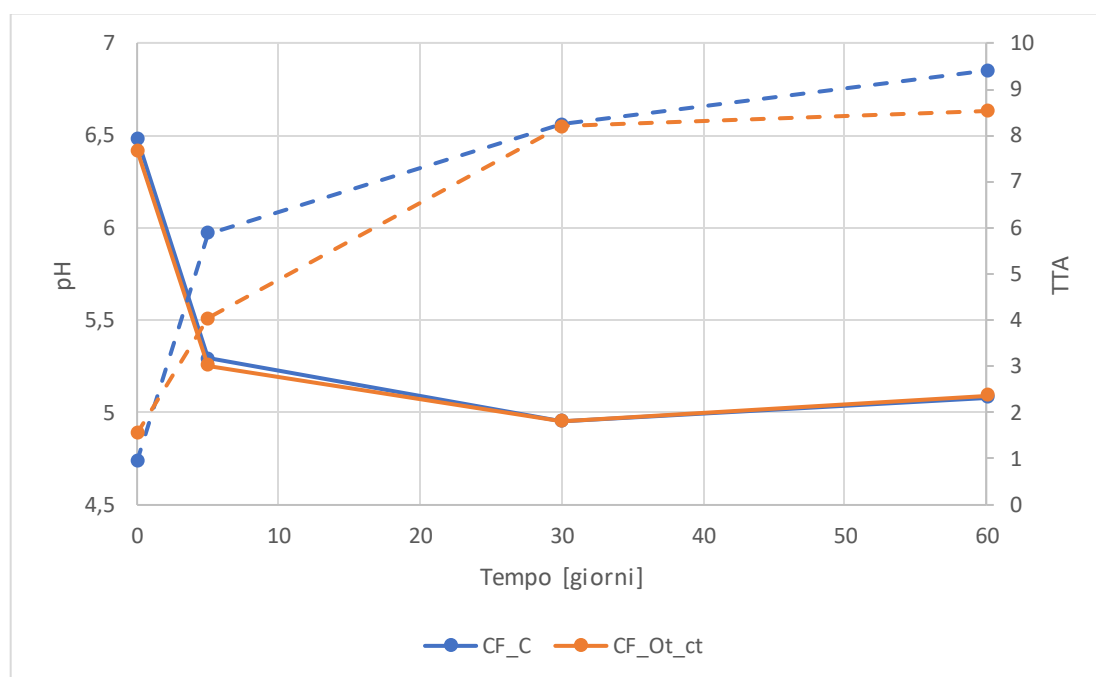


Figura 5: Andamento del pH e della TTA durante la maturazione dei formaggi controllo e sperimentali.

3.2 Analisi microbiologiche

I risultati delle conte vitali in piastra dei diversi gruppi microbici (batteri, lieviti e muffe) sono riportati in tabella 11. Il latte crudo di pecora utilizzato per le caseificazioni era caratterizzato (medie complessive dei due batch, stessa partita di latte per controllo e sperimentale divisa in due aliquote) da valori di batteri mesofili aerobi totali di $5,26 \pm 0,45 \log \text{ufc g}^{-1}$ e conte di $4,76 \pm 0,97$, $5,05 \pm 0,71$, $4,94 \pm 0,94 \log \text{ufc g}^{-1}$ per lattobacilli presuntivi, lattococchi presuntivi e lattococchi termofili presuntivi (LAB, pro-tecnologici), rispettivamente. Per quanto riguarda i

batteri indicatori di igiene e deterioramento, valori di $3,16 \pm 0,47$, $3,41 \pm 0,78$, $2,53 \pm 0,83$, $3,85 \pm 0,25$ log ufc g⁻¹ sono stati trovati per Enterobacteriaceae, coliformi, *Escherichia coli* e Pseudomonadaceae, rispettivamente. Inoltre, è stata riscontrata anche la presenza di muffe ($3,08 \pm 0,47$ log ufc g⁻¹) e lieviti ($3,63 \pm 0,28$ log ufc g⁻¹). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata tra il Caciofiore controllo (CF_C) e sperimentale (CF_Ot_ct) al tempo 0 (t_0), corrispondente alla cagliata messa in forma; i risultati hanno mostrato cariche molto simili a quelle trovate nel latte, ma in alcuni casi si è notata la crescita di circa un ordine di grandezza, come per i lattococchi termofili presuntivi, Enterobacteriaceae (CF_C), coliformi (CF_Ot_ct) ed *Escherichia coli*, probabilmente dovuta al riscaldamento del latte per raggiungere la temperatura ideale per l'aggiunta dei coagulanti. Dopo 5 giorni di maturazione è stata osservata una crescita di circa 3-4 log per tutti i gruppi microbici oggetto di studio e nessuna differenza è stata riscontrata tra CF_C e CF_Ot_ct. Aerobi mesofili totali, lattobacilli presuntivi, lattococchi presuntivi e lattococchi termofili presuntivi hanno raggiunto cariche di circa 9 log ufc g⁻¹; valori compresi tra $6,13 \pm 0,18$ e $7,67 \pm 0,16$ log ufc g⁻¹ sono stati trovati per Enterobacteriaceae, coliformi, *Escherichia coli* e Pseudomonadaceae. Dopo la massima crescita riscontrata al tempo 5, al tempo 30 è stato riscontrato un abbassamento di tutti i gruppi microbici, che ha interessato sia i formaggi controllo che sperimentali, senza alcuna differenza significativa. Valori compresi tra $7,98 \pm 0,50$ e $8,64 \pm 0,51$ log ufc g⁻¹ sono stati trovati per i LAB; le cariche di Enterobacteriaceae e coliformi si sono ridotte di almeno un ordine di grandezza, mentre più lenta è stata la decrescita di *Escherichia coli*. Particolarmente evidente è stata la riduzione delle Pseudomonadaceae ($3,58 \pm 0,50$ e $3,97 \pm 1,12$ log ufc g⁻¹ in CF_C e CF_Ot_ct, rispettivamente al t_30) e delle muffe ($2,93 \pm 1,03$ e $2,89 \pm 0,89$); valori di $4,77 \pm 0,55$ (CF_C) e $4,55 \pm 0,22$ (CF_Ot_ct) log ufc g⁻¹ sono stati trovati per i lieviti al t_30. La caratterizzazione dei formaggi a fine maturazione (t_60) conferma la corrispondenza tra formaggi controllo e sperimentali; infatti, anche in questo caso non sono state riscontrate differenze significative nell'enumerazione dei vari gruppi microbici tra CF_C e CF_Ot_ct. Rispetto al t_30, è stata rilevata una minore decrescita nelle conte vitali di aerobi mesofili totali, lattobacilli presuntivi e lattococchi presuntivi ($< 0,5$ log ufc g⁻¹) rispetto agli altri gruppi batterici. Valori di $5,53 \pm 0,68$ e $5,50 \pm 0,42$, $4,83 \pm 0,05$ e $4,48 \pm 0,00$, $5,77 \pm 0,57$ e $5,79 \pm 0,19$ sono stati trovati per le Enterobacteriaceae, coliformi ed *Escherichia coli* dopo 60 giorni in CF_C e CF_Ot_ct, rispettivamente. Valori dello stesso ordine di grandezza rispetto al campionamento precedente sono stati osservati per le muffe e i lieviti. In figura 12 sono mostrati graficamente gli andamenti dei batteri lattici (pro-tecnologici) e dei batteri indicatori di igiene e deterioramento nel Caciofiore controllo (CF_C, a) e sperimentale (CF_Ot_ct, b).

Campione	Latte		t_0		t_5		t_30		t_60	
	CF_C	CF_Ot_ct	CF_C	CF_Ot_ct	CF_C	CF_Ot_ct	CF_C	CF_Ot_ct	CF_C	CF_Ot_ct
Aerobi mesofili totali	5,26 ± 0,45	5,41 ± 0,12 ^a	5,41 ± 0,12 ^a	5,41 ± 0,16 ^a	9,15 ± 0,29 ^a	8,98 ± 0,07 ^a	8,53 ± 0,48 ^a	8,60 ± 0,24 ^a	8,42 ± 0,12 ^a	8,12 ± 0,13 ^a
Lattobacilli presuntivi	4,76 ± 0,97	5,16 ± 0,29 ^a	4,89 ± 0,34 ^a	4,89 ± 0,34 ^a	9,15 ± 0,21 ^a	8,97 ± 0,05 ^a	8,55 ± 0,53 ^a	8,59 ± 0,18 ^a	8,49 ± 0,27 ^a	8,26 ± 0,04 ^a
Lattococchi presuntivi	5,05 ± 0,71	5,27 ± 0,29 ^a	5,22 ± 0,30 ^a	5,22 ± 0,30 ^a	9,19 ± 0,15 ^a	9,13 ± 0,07 ^a	8,64 ± 0,51 ^a	8,07 ± 0,50 ^a	8,19 ± 0,19 ^a	7,81 ± 0,17 ^a
Lattococchi termofili presuntivi	4,94 ± 0,94	5,29 ± 0,28 ^a	5,96 ± 1,30 ^a	5,96 ± 1,30 ^a	9,20 ± 0,18 ^a	9,11 ± 0,17 ^a	8,30 ± 0,55 ^a	7,98 ± 0,50 ^a	8,16 ± 0,15 ^a	7,70 ± 0,15 ^a
Enterobacteriaceae	3,16 ± 0,47	4,31 ± 0,33 ^a	3,53 ± 1,38 ^a	3,53 ± 1,38 ^a	7,35 ± 0,16 ^a	7,67 ± 0,16 ^a	6,11 ± 0,17 ^a	6,52 ± 0,24 ^a	5,53 ± 0,68 ^a	5,50 ± 0,42 ^a
Coliformi	3,41 ± 0,78	3,53 ± 1,09 ^a	4,28 ± 0,22 ^a	4,28 ± 0,22 ^a	7,23 ± 0,26 ^a	7,35 ± 0,46 ^a	5,90 ± 0,10 ^a	6,08 ± 0,84 ^a	4,83 ± 0,05 ^a	4,48 ± 0,00 ^a
Escherichia coli	2,53 ± 0,83	3,37 ± 0,52 ^a	3,61 ± 0,53 ^a	3,61 ± 0,53 ^a	6,75 ± 0,22 ^a	7,16 ± 0,21 ^a	6,32 ± 0,30 ^a	6,68 ± 0,12 ^a	5,77 ± 0,57 ^a	5,79 ± 0,19 ^a
Pseudomonadaceae	3,85 ± 0,25	3,75 ± 0,12 ^a	3,82 ± 0,06 ^a	3,82 ± 0,06 ^a	6,13 ± 0,18 ^a	6,30 ± 0,12 ^a	3,58 ± 0,50 ^a	3,97 ± 1,12 ^a	2,77 ± 0,14 ^a	2,11 ± 0,00 ^a
Muffe	3,08 ± 0,47	2,81 ± 0,38 ^a	2,75 ± 0,32 ^a	2,75 ± 0,32 ^a	5,43 ± 0,73 ^a	5,31 ± 0,39 ^a	2,93 ± 1,03 ^a	2,89 ± 0,89 ^a	2,50 ± 0,06 ^a	2,49 ± 0,13 ^a
Lieviti	3,63 ± 0,28	3,34 ± 0,31 ^a	3,42 ± 0,18 ^a	3,42 ± 0,18 ^a	6,72 ± 0,87 ^a	5,84 ± 0,73 ^a	4,77 ± 0,55 ^a	4,55 ± 0,22 ^a	4,48 ± 0,35 ^a	4,55 ± 0,37 ^a

Tabella 11: Risultati delle conte vitali (log cfu g⁻¹); lettere differenti nella stessa riga allo stesso tempo di campionamento indicano differenze tra CF_C e CF_Ot_ct secondo il test di Tukey's (P<0,05).

I batteri lattici sono risultati prevalenti nell'intera fase di maturazione (dal t_0 al t_60); per i coliformi totali e nelle Pseudomonadaceae è stata osservata una riduzione più rapida rispetto alle Enterobacteriaceae e *Escherichia coli*, per cui è stato osservato un andamento simile ai LAB. In generale, dai risultati delle conte vitali è possibile affermare che non è stato rilevato un particolare effetto del coagulante sperimentale rispetto al coagulante commerciale; la microflora iniziale del latte e le condizioni del processo di produzione e maturazione sono stati i fattori che hanno maggiormente influenzato le dinamiche microbiche nel Caciofiore (CF_C e CF_Ot_ct).

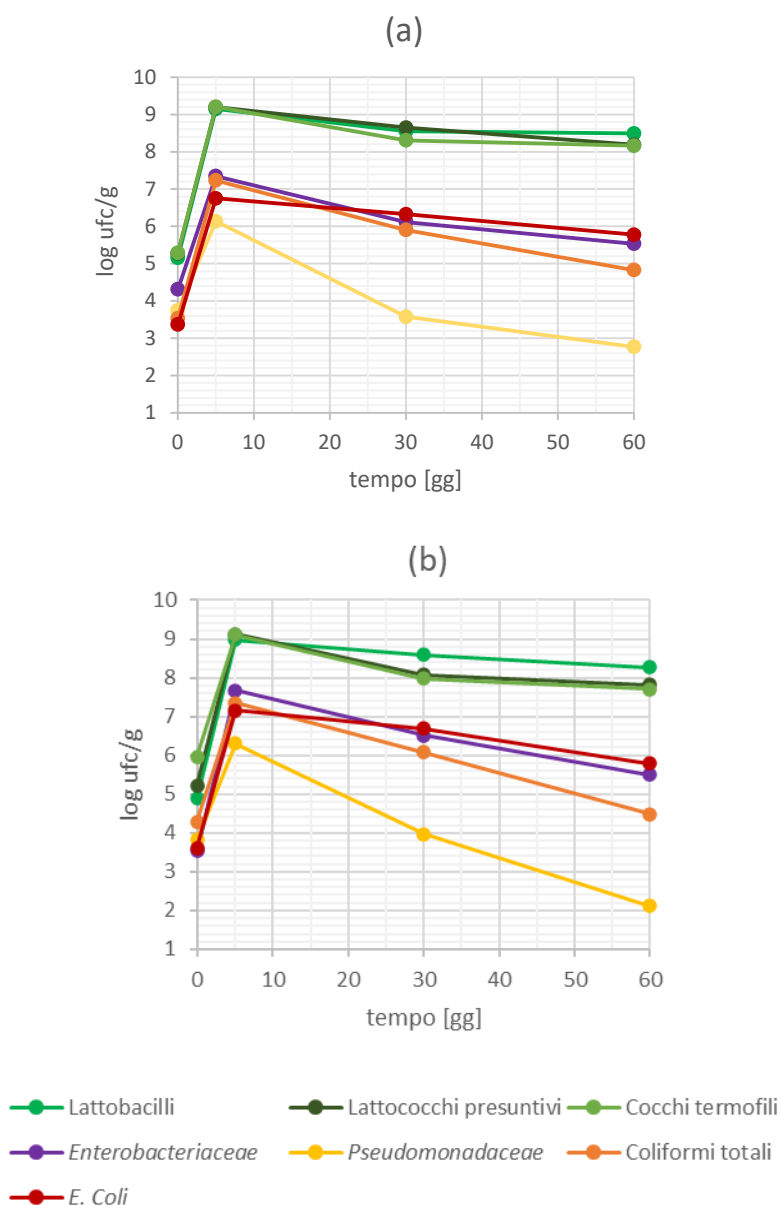


Figura 6: Andamento dei LAB e batteri indice di igiene e deterioramento secondo i risultati delle conte vitali in piastra in CF_C (a) e CF_Ot_ct (b).

CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente elaborato di tesi era quello di comprendere l'effetto di un nuovo coagulante sperimentale ottenuto da fiori coltivati di *Onopordum tauricum* sulle dinamiche microbiche del formaggio Caciofiore.

Dai risultati delle analisi chimico-fisiche e microbiologiche effettuate sui formaggi sperimentali e controllo non sono emerse differenze significative; ciò dimostra che i formaggi sperimentali sono paragonabili ai formaggi controllo e che i fattori che hanno influenzato maggiormente la crescita dei gruppi microbici ricercati sono stati la microflora iniziale del latte e le condizioni operative del processo di produzione del formaggio Caciofiore.

I batteri lattici sono stati predominanti durante l'intera fase di maturazione, ma un andamento simile di crescita è stato osservato anche per le Enterobacteriaceae.

Il Caciofiore è un formaggio prodotto con latte crudo e senza l'aggiunta di colture starter; particolare attenzione deve essere rivolta all'igiene e al controllo dei parametri di processo per garantire prodotti idonei dal punto di vista della sicurezza alimentare.

Ulteriori analisi basate su metodi coltura-indipendenti (sequenziamento) permetteranno di ottenere una caratterizzazione microbiologica completa, confermare i risultati collezionati e promuovere l'utilizzo del coagulante sperimentale finora risultato promettente.

BIBLIOGRAFIA

- Alavi, F., & Momen, S. 2020. Aspartic proteases from thistle flowers: Tradition coagulants used in modern cheese industry. *International Dairy Journal*, 107, 104709.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104709>
- Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osimani, A., Petruzzelli, A., & Clementi, F. 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 651-659.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03053.x>
- Aworth, O. C., & Muller, H.G. 1987. Cheese-making properties of vegetable rennet from sodom apple (*Calotropis procera*). *Food Chemistry*, 26, 71-79.
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(87\)90168-3](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90168-3)
- Barbosa, M., Corradini, C., & Battistoni, B. 1981. Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Food and Agriculture Organization of the United Nation*, 5, 307-312.
- Cardinali, F., Osimani, A., Taccari, M., Milanović, V., Garofalo, C., Clementi, F., Polverigiani, S., Zitti, S., Raffaelli, N., Mozzon, M., Foligni, R., Franciosi, E., Tuohy, K., & Aquilanti, L. 2017. Impact of thistle rennet from *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* on bacterial diversity and dynamics of a specialty Italian raw ewes' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 7-16.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.018>.
- Cardinali, F., Taccari, M., Milanović, V., Osimani, A., Polverigiani, S., Garofalo, C., Mozzon, M., Zitti, S., Raffaelli, N., Clementi, F., & Aquilanti, L. 2016. Yeast and mould dynamics in Caciofiore della Sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia*. *Wiley Online Library*, 33, 403-414.
<https://doi.org/10.1002/yea.3168>

Cattaneo, T., Nigro, F., Messina, G., & Giangiacomo, R. 1994. Effect of an enzymatic complex from pineapple pulp on the primary clotting phase. *Milchwissenschaft*, 49, 269-272.

Chazarra, S., Sidrach, L., Molina, D. L., & Rodriguez-López, J.N. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393-1400.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>

Cordeiro, M.C., Pais, M.S., & Brodelius, P.E. 1994. Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, 92, 645-653.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb03035.x>

De Falco, B., Incerti, G., Amato, M., & Lanzotti, V. 2015. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 14, 993-1018.

<https://doi.org/10.1007/s11101-015-9428-y>

Del Franco, F. 2022. Caglio e dintorni: i microbici e da chimosina ricombinante. *Ruminantia*. Recuperato da [Caglio e dintorni: i microbici e da chimosina ricombinante – Ruminantia – Web Magazine del mondo dei Ruminanti](#)

Farris, G.A., Gobbetti, M., Neviani, E., & Vincenzini, M. (Eds). 2012. *Microbiologia dei prodotti alimentari*, 1, 419-420. Casa editrice Ambrosiana.

Fernández-Salguero, J., & Sanjuán E. 1999. Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177-183.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6)

Fernandez-Salguero, J., & Tejada, L. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant of calf rennet. *Italian Journal of Food Science*, 15.1, 125-132. Recuperato da

<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2004062165>

Fiorucci., E., & Di Berardino, A. 2021. La coagulazione del latte e le tipologie di caglio. Recuperato da <https://www.ruminantia.it/la-coagulazione-del-latte-e-le-tipologie-di-caglio/>

Formaggio da caglio di cardo, origini antiche per un prodotto innovativo rilanciato grazie a progetto di ricerca. 2007. Recuperato da [Formaggio da caglio di cardo. Origini antiche per un prodotto innovativo rilanciato grazie a progetto di ricerca | Agricoltura.it](#)

Freitas, C., & Malcata, F. X. 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 584-602.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74918-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74918-6)

Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. 2008. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18, 93-98.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.003>.

Garg, S.K., & Johri, B.N. 2009. Rennet: current trends e future research. *Food reviews international*, 10, 313-355.
<https://doi.org/10.1080/87559129409541005>

Gostin, A., & Waisundara, V. 2019. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Food Science & Technology*, 86, 381-391.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.015>.

Hashim, M.M., Dong, M., & Iqbal, M.F. 2011. Ginger protease used as coagulant enhances the proteolysis and sensory quality of Peshawari cheese compared to calf rennet. *Dairy Science & Technology*, 91, 431-440.
<https://doi.org/10.1007/s13594-011-0021-x>

Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Silva Figueiredo, A.C., & Pais, M.S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405-1410.

[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80090-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80090-4).

Ibiama, E., & Griffiths, M.W. 1987. Studies on a milkcoagulating enzyme, 'Calotropain', obtained from sodom apple (*Calotropis porcera*). *Journal of Food Agriculture*, 1, 157-162.

Liburdi, K. 2019. I coagulanti vegetali per la produzione di formaggi di elevata qualità.

Recuperato da <https://agronotizie.imagelinenetwork.com/zootecnia/2019/11/11/i-coagulanti-vegetali-per-la-produzione-di-formaggi-di-elevata-qualita/64853>

Lo Piero, A.R., Puglisi, I., & Petrone, G. 2002. Characterisation of 'lettucine', a serine-like protease from *Lectuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2439-2443.

<https://doi.org/10.1021/jf011269k>

Mozzon, M., Foligni, R., Mannozi, C., Zamporlini, F., Raffaelli, N., & Aquilanti, L. 2020. Clotting Properties of *Onopordum tauricum* (Willd.). Aqueous extract in milk of different species. *Foods*, 9, 692.

<https://doi.org/10.3390/foods9060692>

Nicosia, F.D., Puglisi, I., Pino, A, Caggia, C, & Randazzo, C.L. 2022. Plant Milk-Clotting Enzymes for Cheesemaking. *Foods*, 11, 871.

<https://doi.org/10.3390/foods11060871>

Ordiales, E., Martín, A., Benito, M. J., Hernández, A., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M. 2012. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in "Torta del Casar" cheese-making. *Food Chemistry*, 133, 227-235.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.012>.

Roa, I., Lopez, M.B., & Mendiola, F.J. 1999. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food research international*, 32, 143.

[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00098-8)

Robinson, R. K., Scott, J.E., Scotti, R., & Wilbey, A. (Eds). 1998. *Cheesemaking Practice*, 3. Springer Publisher.

Roseiro, L.B., Barbosa, M., M Ames, J., & Wilbey, A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.

<https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>

Silva, A.C., Nascimento, T.C.E.S., Herculano, P.N., & Moreira, K.A. 2013. Potential of quixaba (*Sideroxylon obtusifolium*) latex as a milk-clotting agent. *Food Science and Technology*, 33, 3.

<https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000075>

Silva, S.V., Barros, R.M., & Malcata, F.X. 2002. Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of food science*, 67, 1746-1751.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08717.x>

Tavaria, F., Sousa, M.J., Domingos, A., Malcata, F.X., Brodelius, P., Clemente, A., & Pais, M.S. 1997. Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3760-3765.

Veringa, H.A. 1961. Rennet substitutes - a review. *Dairy Science Abstracts*, 23, 197-200.

Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C., & Pires, E. 1995. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus L.* contains two proteinases with chymosin and pepsin - like specificities. *Biotechnology Letters*, 17, 621-626.

<https://doi.org/10.1007/BF00129389>

Vieira de Sá, F., & Barbosa, M. 1970. Activité coagulante comparee d'une presure vegetale extraite du chardon (*Cynara cardunculus*) et de la presure animale. Proceedings XVIII International Dairy Congress, 1, 292.

Vioque, J., Vioque-Sánchez, R., Clemente, A., Pedroche, J., & Millán, F. 2000. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. Journal of the American Oil Chemists' Society, 77, 447-450.

<https://doi.org/10.1007/s11746-000-0072-y>

Zenobi, S., Fiorentini, M., Aquilanti, L., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., Zitti, S., Casavecchia, S., Dridi B.A.M., & Orsini, R. 2021. Effect of planting density in two thistle species used for vegetable rennet production. Marginal Mediterranean Areas. Agronomy, 11, 135.

<https://doi.org/10.3390/agronomy11010135>